

Method for the treatment of bone tissues and implantable biomaterials thereof.

Patent Number: ☐ [EP0603920](#), [B1](#)
Publication date: 1994-06-29
Inventor(s): COMBES DIDIER (FR); FAGES JACQUES (FR); MARTY ALAIN (FR); CONDORET JEAN-STEPHANE (FR)
Applicant(s): BIOLAND SARL (FR)
Requested Patent: DE69324117T
Application Number: EP19930203267 19931123
Priority Number(s): FR19920015577 19921221
IPC Classification: A61L27/00
EC Classification: [A61F2/46G](#), [A61L24/00F](#), [A61L27/36](#)
Equivalents: [CA2110527](#), [CN1072970B](#), [CN1090206](#), [DE69324117D](#), [ES2130216T](#),
☐ [FR2699408](#), ☐ [JP6218036](#)
Cited Documents: [WO8703812](#); [GB2175506](#); [WO9107194](#)

Abstract

The present invention relates to a method for treating bone tissues of animal or human origin, and a corresponding implantable biomaterial. According to the present invention, a fluid in the supercritical state is made to penetrate throughout the bone tissue. The bone tissue thus treated may then undergo stages of extraction of specific proteins. This tissue is ready to be fitted on a damaged bone tissue and

has mechanical properties at least equivalent to those of natural bone. 

Data supplied from the esp@cenet database - I2



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Übersetzung der
eur päischen Patentschrift

97 EP 0 603 920 B 1

10 DE 693 24 117 T 2

51 Int. Cl.⁶:
A 61 L 27/00

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 693 24 117.9
95 Europäisches Aktenzeichen: 93 203 267.5
96 Europäischer Anmeldetag: 23. 11. 93
97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 29. 6. 94
97 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 24. 3. 99
47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18. 11. 99

DE 693 24 117 T 2

- 30 Unionspriorität:
9215577 21. 12. 92 FR
- 73 Patentinhaber:
Bioland S.A.R.L., Toulouse, FR
- 74 Vertreter:
Dr. Weitzel & Partner, 89522 Heidenheim
- 84 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,
NL, PT, SE

- 72 Erfinder:
Fages, Jacques, F-31120 Portet sur Garonne, FR;
Marty, Alain, F-31400 Toulouse, FR; Combes, Didier,
F-31750 Escalquens, FR; Condoret, Jean-Stephane,
F-31400 Toulouse, FR

- 54 Verfahren zur Behandlung von Knochengeweben und implantierbare Biomaterialien dafür

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 24 117 T 2

15.08.99

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Knochengewebe und von entsprechenden implantierbaren Biomaterialien.

Insbesondere ermöglicht ein solches Verfahren die
5 Behandlung von Knochengewebe mit dem Ziel, dieses einem Menschen zu implantieren. Ein solches Gewebe darf keine (oder wenigstens im geringstmöglichen Ausmaß) Abstoßungsreaktionen hervorrufen, und es muß eine gute Knochenübertragungsfähigkeit aufweisen, das heißt, es muß
10 die Bildung und Wanderung von neu gebildetem Knochengewebe durch den Empfänger fördern.

Das Transplantieren von Knochengewebe ist eine Technik, die täglich Bestandteil der meisten orthopädischen Chirurgieeingriffe in der ganzen Welt ist. Dabei kann es
15 sich um drei Arten von Transplantationen handeln, nämlich:

- Allotransplantationen,
- Autotransplantationen,
- Xenotransplantationen.

Bei Alloknochen-transplantationen wird Knochengewebe von
20 einem Spender zu einem Empfänger derselben Spezies transplantiert, der aber nicht der Spender ist. Bei Autoknochen-transplantationen wird Knochengewebe entnommen und im selben Individuum transplantiert. Bei Xenoknochen-transplantationen wird tierisches Knochengewebe
25 (häufig vom Schwein oder vom Rind) auf einen Menschen transplantiert.

Zur Durchführung dieser Transplantationen wird zunächst Knochengewebe behandelt, indem es mechanisch gereinigt und von allen Substanzen befreit wird, die seiner Implantation
30 hinderlich sind. Dabei stellt man bei den Behandlungsmethoden nach dem Stand der Technik fest, daß sich die mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes geändert haben. In der Tat tragen die extrahierten organischen Substanzen zu den mechanischen Eigenschaften des
35 Knochens bei. Folglich wird eine Transplantation eines Knochenimplantats im allgemeinen an den Enden von Neubildungen des Skeletts in einem Abschnitt vorgenommen, der Festigkeitsproblemen unterliegt, wo die mechanischen Eigenschaften wesentlich sind. Infolgedessen wäre es

15.08.99

2

vorteilhaft, Knochentransplantate bereitzustellen, die die gleichen oder sogar bessere mechanische Eigenschaften besitzen als der natürliche Knochen.

- Zum Beispiel wären solche Transplantationen in orthopädischen Anwendungsbereichen angezeigt, insbesondere wenn das Transplantat belastet wird, nämlich insbesondere: in der Wirbelsäulenchirurgie (Halswirbelfusion, Bandscheibenersatz, ...), Gelenkpfannenneubildungen, Arthroplastie, Osteotomie, Pseudarthrose, Arthrodeese, ...
- 10 Somit würde bei Einsatz des Transplantats zur Neubildung eines Teils des Skeletts, der eine implantierte Prothese trägt (Gelenkprothese, Zahnprothese ...), die Verwendung eines Transplantats, dessen mechanische Festigkeit, insbesondere der Kompressionswiderstand, der des
- 15 ursprünglichen Knochens, der sich verschlechtert hat, überlegen wäre, einen großen Vorteil vom Standpunkt der Langlebigkeit der Funktion der Prothese her gesehen darstellen. Und das Transplantat, das zwischen die Prothese und den natürlichen Knochen gesetzt wurde, würde die
- 20 Variationen mechanischer Eigenschaften progressiver machen und die Qualität der Übertragung von Beanspruchungen verbessern und dabei zu starke örtliche Widerstandsgradienten vermeiden. Außerdem würde, wenn das Transplantat von seiner Implantation an dieselbe
- 25 Widerstandsfähigkeit hätte wie der Knochen, jedes Verschlechterungsrisiko während der Resorption des Transplantats durch ein neugebildetes Knochengewebe vermieden.

- Die Erfindung schlägt daher ein implantierbares
- 30 Biomaterial vor, dessen mechanische Eigenschaften, insbesondere der Kompressionswiderstand, wenigstens gleichwertig sind mit denen des natürlichen Knochens. Insbesondere schlägt die Erfindung ein implantierbares Biomaterial vor, dessen Kompressionswiderstand das 1 bis
- 35 2fache dessen des natürlichen Knochens betragen kann.

Außerdem schlägt die Erfindung auch ein Biomaterial vor, das die Wirksamkeit von Knochentransplantaten

15.08.99

3

verbessert, sowohl vom mechanischen als auch vom biologischen Standpunkt her gesehen.

In der Tat sind Allotransplantate mit zahlreichen Nachteilen behaftet. Zunächst bestehen zahlreiche
5 Infektionsrisiken in Verbindung mit der Übertragung von Knochengewebe eines Individuums auf ein anderes. Dies gilt insbesondere für die Übertragung des HIV-Virus von AIDS. Angesichts der starken Zunahme dieser Krankheit ist dieses Infektionsrisiko in den letzten Jahren stark gestiegen. Von
10 diesen Infektionsrisiken abgesehen, die auch andere Viren betreffen, betreffen die Hauptkomplikationen in Verbindung mit der Verwendung von Allotransplantaten Brüche, eine schlechte Rekolonisation der implantierten Knochengewebe (Transplantate) und von Abstoßungsreaktionen des Implantats.
15 Die schlechte Rekolonisation von Transplantaten stellt heute ein wichtiges Problem dar. In der Tat sollen die Gewebe des Transplantats resorbiert, überwuchert und dann durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt werden. Aber diese Rehabilitation ist bis heute noch eher schwach.

20 Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein implantierbares Knochengewebe herzustellen, das in bezug auf Infektionsanfälligkeit und Immunreaktionen sicher ist.

Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, daß ein solches Knochengewebe eine gute Knochenübertragungsfähigkeit besitzt
25 (d.h. eine gute Rekolonisation von Transplantaten erleichtert).

Autotransplantate werden häufig gegenüber Allotransplantaten bevorzugt, weil sie besser rekolonisiert werden und eher bereit sind, Knochenzellen zum
30 Transplantationsort zu bringen. Dies hat zur Folge, daß die Infektions- und Immunreaktionsrisiken wesentlich geringer sind, aber diese Art der Praxis ist nicht vollkommen zufriedenstellend. Sie ist tatsächlich schmerzhaft, wird vom Patienten häufig schlecht akzeptiert und es bestehen
35 Komplikationsrisiken beim Spender. Außerdem erfordern zahlreiche Eingriffe große Mengen an Knochengewebe, das mit dem Autotransplantat inkompatibel ist.

15.05.99

4

Auch die Xenotransplantate weisen zahlreiche Nachteile auf. Im allgemeinen rufen diese Transplantate starke Immunreaktionen (Abstoßung) hervor. Um diesen Nachteil zu beheben, wurden verschiedene Versuche unternommen mit dem Ziel, diese Reaktionen abzuschwächen oder zu unterdrücken. Ihr Prinzip liegt gewöhnlich in einer Entproteinisierung des Knochengewebes vor der Implantation. In der Tat sind die im Knochengewebe enthaltenen Proteine der Ursprung eines Teils der Abstoßungsreaktionen. Diese Abstoßungsreaktionen stehen auch mit der Anwesenheit von zellulärem Debris in Markgeweben und den anderen Elementen dieser Gewebe in Verbindung.

Um die Proteine des Knochengewebes zu extrahieren, werden bekanntermaßen organische Lösungsmittel verwendet. Die folgenden Lösungsmittel werden dabei am häufigsten verwendet: Ethylendiamin, Wasserstoffperoxid, verschiedene chlorierte Lösungsmittel wie Chloroform oder Dichlormethan, aber auch Ethanol und Aceton. Die Mehrzahl der auf diese Weise entproteinisierten Knochengewebe zeigen keine oder nur wenig Immunreaktion. Es wird im allgemeinen eine gute Gefäßneubildung beobachtet, und sie werden von den osteogenen Zellen des Empfängers überwuchert. Und dennoch haben sie an sich keine eigene Knochenübertragungsfähigkeit. Ihre mechanische Festigkeit ist im allgemeinen der des natürlichen Knochens unterlegen oder von derselben Größenordnung.

Man stellt jedoch fest, daß die für die Entproteinisierung verwendeten Lösungsmittel häufig äußerst toxisch sind. Aus diesem Grund müssen die Knochengewebe sorgfältig gespült werden (was bei ihrer Porösität nicht einfach ist), um eine Verschmutzung des Empfängerortes zu verhüten.

Das Patent FR-A-2.654.625 beschreibt ein Verfahren zur Entproteinisierung unter Verwendung solcher toxischer Lösungsmittel in Verbindung mit einem selektiven Extraktionsmittel auf Harnstoffbasis. Ein solches Verfahren geht aber trotz allem auf Kosten einer sehr heterogenen

15.08.99

5

Entfettung, da gemäß diesem Patent zwischen 0,5 und 5% Lipide zurückbleiben können.

Fluide im überkritischen Zustand sind bereits zum Extrahieren von diversen Materien wie Lipiden, Proteinen, Nukleotiden, Sacchariden von tierischen Geweben oder Organen bekannt. Trotzdem werden diese bekannten Verfahren als komplex und aufwendig in der praktischen Umsetzung angesehen, ohne die in anderen Extraktionsverfahren vorherrschenden Vorteile zu bieten.

10 Somit lehrt der Stand der Technik nicht die Möglichkeit der Durchführung einer Extraktion von organischer Materie bei der Behandlung von Knochengewebe, nach der die mechanische Festigkeit des Knochengewebes verbessert wird.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Gesamtheit der Nachteile des Standes der Technik zu beheben und insbesondere ein implantierbares Knochengewebe mit verbesserter mechanischer Festigkeit im Vergleich zu dem des natürlichen Knochens vorzuschlagen, das im Hinblick auf Infektion und Immunität sicher ist, eine gute Knochenübertragungsfähigkeit aufweist und keine toxischen Produkte freisetzt. Es ist insbesondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren vorzuschlagen, das die Behandlung eines solchen Knochengewebes zuläßt.

Demzufolge betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von tierischen oder menschlichen Knochengeweben für den Erhalt eines Biomaterials, das in einen Menschen implantiert und mechanisch beansprucht werden kann, wobei das Knochengewebe von der gesamten es umgebenden organischen Materie mechanisch gereinigt und die organische Materie aus dem Knochengewebe extrahiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens einen Schritt beinhaltet, in dem ein Fluid im überkritischen Zustand in die Gesamtheit des Knochengewebes eindringen gelassen wird.

Die Erfinder haben auch mit Überraschung festgestellt, daß allein das In-Kontakt-Bringen des Knochengewebes mit einem überkritischen Fluid im Verlauf der Behandlung dessen mechanische Festigkeit schon während der Extraktion der

15.05.99
6

organischen Materien verstärkt.

Erfindungsgemäß wird das Fluid im überkritischen Zustand während des Extraktionsschrittes der in dem Gewebe vorhandenen, im wesentlichen lipidhaltigen organischen
5 Materien in das Knochengewebe eindringen gelassen und wird in dem Fluid im überkritischen Zustand aufgelöst. Die auf diese Weise mit diesem überkritischen Fluid durchgeführte Extraktion weist die Qualitäten auf, die besonders für das Knochengewebe geeignet sind.

10 Erfindungsgemäß setzt sich das Verfahren aus den folgenden Schritten zusammen:

a) mechanisches Reinigen des Knochengewebes von der gesamten es umgebenden organischen Materie,

b) Zerschneiden dieses Knochengewebes nach einer
15 vorbestimmten Form,

c) Reinigen des Knochengewebes, um daraus die für eine gute Neuimplantation schädlichen Bestandteile zu extrahieren, wobei in die Gesamtheit des Knochengewebes ein Fluid im überkritischen Zustand eindringen gelassen wird,

20 das in der Lage ist, die in dem Gewebe vorhandene, im wesentlichen lipidhaltige organische Materie aufzulösen und zu extrahieren,

d) Waschen, Dehydrieren und Sterilisieren des auf diese Weise gereinigten Knochengewebes. Der Reinigungsschritt c)
25 besteht außerdem in der chemischen und/oder enzymatischen Behandlung des Knochengewebes, um daraus bestimmte verbleibende Proteine zu extrahieren.

Ein Fluid im überkritischen Zustand bedeutet, daß es eine schwache dynamische Viskosität (nahe der eines Gases),
30 einen hohen Diffusionskoeffizient, eine sehr schwache Oberflächenspannung und eine hohe Volumenmasse (nahe der einer Flüssigkeit) hat und leicht durch poröse Materie diffundiert, ohne Benetzungsprobleme. Darüber hinaus ist das Auflösungsvermögen eines solchen Fluids hoch (nahe dem von
35 Flüssigkeiten, mit dem Potential, das 10⁸fache von dem eines Gases zu erreichen), und kann durch Variieren des Drucks moduliert werden. Die Folge ist, daß ein solches Fluid im

überkritischen Zustand leicht und praktisch vollständig die im Knochengewebe vorhandenen, im wesentlichen lipidhaltigen organischen Materien auflöst. Die Immunreaktions- und Infektionsrisiken sind daher beträchtlich herabgesetzt.

- 5 Einer der Vorteile der Erfindung liegt in der Verwendung von Kohlendioxid (CO_2) insofern, als das dieses bildende Fluid im überkritischen Zustand in der Tat zahlreiche interessante Eigenschaften aufweist, nämlich:

- seine kritische Temperatur von 31°C ist niedrig.

- 10 Daher kann das Kohlendioxid im überkritischen Zustand vorliegen, und es kann bei einer Temperatur von etwa 31°C für einen Druck von etwa 7,38 MPa gearbeitet werden. Gemäß dem beaufschlagten Druck kann daher bei Temperaturen zwischen 31° und 60°C gearbeitet werden, bei denen die
15 einzige mögliche Änderung des Knochengewebes eine Entnaturisierung des Kollagens ist, die ihm seinen Antigencharakter entzieht,

- sein Auflösungsvermögen ist ausgezeichnet, insbesondere bei Lipiden. So ist beispielsweise bekannt, daß
20 zahlreiche Fettsäuren und Triglyceride Auflösungsvermögen von bis zu 10% in Kohlendioxid im überkritischen Zustand haben können. Folglich liegen diese Lipide in großer Menge in Markgeweben vor; die den spongiösen Knochen sättigen, sie sind stark antigen und lassen sich immer nur schwer
25 beseitigen; da sie darüber hinaus nicht benetzbar sind, bilden sie eine physikalische Barriere gegen eine Rekolonisation des Transplantats,

- es verstärkt die biomechanischen Eigenschaften des Knochens und fördert die Osteointegration des implantierten
30 Knochengewebes,

- es handelt sich um ein Naturprodukt ohne jegliche Toxizität,

- es ist leicht erhältlich und stellt keinerlei Gefahr für das behandelte Produkt oder für den Experimentator dar.

- 35 Die Behandlung des Knochengewebes wird durch eine chemische oder enzymatische Behandlung abgeschlossen, die besonders an die Extraktion von in dem Knochengewebe

vorliegender Proteinmaterie angepaßt ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein implantierbares Biomaterial, das nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wurde und aus Knochengewebe besteht, das
5 gereinigt und mit einem Fluid im überkritischen Zustand in Kontakt gebracht wurde, wobei das genannte Gewebe einem Menschen am Ort eines beschädigten Knochengewebes implantiert werden kann.

Erfindungsgemäß wurde das Knochengewebe durch
10 Extraktion mit Hilfe des Fluids im überkritischen Zustand von im wesentlichen lipidhaltiger organischer Materie befreit.

Ein solches Material weist eine Festigkeit auf, die der des natürlichen Knochens gleichwertig oder überlegen ist,
15 ist im Hinblick auf Infektion und Immunreaktion sicher, weist keinerlei Toxizität auf und besitzt aufgrund der praktisch vollständigen Extraktion der ursprünglich enthaltenen Lipide eine gute Knochenübertragungsfähigkeit.

Weitere Aufgaben, Eigenschaften und Vorteile der
20 vorliegenden Erfindung gehen aus der nachfolgenden Beschreibung, die beispielhaft und nicht begrenzend zu verstehen ist, unter Bezugnahme auf das beiliegende Diagramm hervor, das eine Anlage für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens darstellt.

25 Die in der Figur dargestellte Anlage umfaßt einen Reaktor 1, in den das Knochengewebe 2 gelegt wird und durch den ein Kohlendioxidstrom (CO_2) im überkritischen Zustand geleitet wird.

Das Kohlendioxid wird im flüssigen Zustand in einer
30 Flasche 3 vorrätig gehalten, durch ein Filter 4 geleitet, in einem Kühlaggregat 5 auf eine Temperatur abgekühlt, bei der es mit Sicherheit flüssig ist, in der Größenordnung von 0°C , und dann in einen Zwischenbehälter 6 geleitet. Eine Dosierpumpe 7 ist dem Behälter 6 nachgeschaltet, um das
35 flüssige Kohlendioxid auf einen Druck zu komprimieren, der dessen Fluß im überkritischen Zustand zuläßt. Ein Ventil 8 befindet sich unterhalb der Pumpe 7, um den Reaktor 1 zum

15.06.99

9

Füllen oder Entleeren zu isolieren. Vor dem Einleiten in den Reaktor 1 wird das Kohlendioxid mit einem Vorwärmer 9 vorgewärmt, so daß sich das Kohlendioxid am Ausgang dieses Vorwärmers 9 im überkritischen Zustand befindet. Das Kohlendioxid fließt durch den Reaktor 1 und verläßt ihn am dem Einleitungsende gegenüberliegenden Ende. Ein Ventil 10 befindet sich unterhalb des Reaktors 1, damit der Kreislauf isoliert werden kann. Das Ventil 10 läßt auch einen Druckabfall vor der Einleitung des Kohlendioxids in einen ersten Abscheider 11 zu. Die im Kohlendioxid aufgelöste Materie wird am Ausgang 12 des Abscheiders 11 zurückgewonnen. Die Anlage umfaßt auch eine zweite Abscheidungsstufe, die ein Ventil 13 für einen weiteren Druckabfall und einen zweiten Abscheider 14 umfaßt, der einen Ausgang 18 für die Rückgewinnung organischer Materie aufweist. Es können bei Bedarf mehr als zwei Abscheidungsstufen vorgesehen werden. Das Kohlendioxid wird an den Ausgängen 12, 18 der Abscheidungsstufen über ein Ventil 15 wieder in den Kreislauf rezykliert. Die Flasche 3 ist mit diesem geschlossenen Kreislauf über ein Rückschlagventil 16 und ein Ventil 17 verbunden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Behandlung von Knochengewebe wird nachfolgend beschrieben.

Es wird auf konventionelle Weise damit begonnen, den Knochen mechanisch zu reinigen und ihn dann auf die gewünschten Maße und auf eine vorbestimmte Form zuzuschneiden. Das Knochengewebe kann beispielsweise die Form eines Quaders, eines Zylinders oder jede andere beliebige geeignete Form haben. Dieses Knochengewebe wird dann in den Extraktionsreaktor 1 gegeben. Die optimalen Betriebsbedingungen werden kombiniert im Hinblick auf eine Temperatur im Bereich zwischen 31° und 60°C und einen Druck in der Größenordnung von $1,5 \times 10^7$ bis 4×10^7 Pa.

Das Kohlendioxid CO_2 wird in flüssiger Form mit einer Dosierpumpe 7 gepumpt. Die Flüssigkeit wird vor dem Extraktionsreaktor 1 vorgewärmt und dann im überkritischen Zustand in diesen eingeleitet.

Man wird sich erinnern, daß Fluide im überkritischen Zustand als Gase definiert werden können, die sich unter solchen Temperatur- und Druckbedingungen befinden, daß ihre Eigenschaften zwischen denen von Gasen und denen von
5 Flüssigkeiten liegen. Man nennt sie auch "dichte Gase" oder "expandierte Flüssigkeiten". Für ein bestimmtes chemisches Volumen wird der genaue Punkt auf der Temperatur-Druck-Kurve, an dem die beiden Phasen flüssig und gasförmig zusammenfallen, als kritischer Punkt bezeichnet. Jenseits
10 dieser kritischen Temperatur (T_c) und dieses kritischen Drucks (P_c) befindet sich das Fluid im sogenannten "überkritischen" Zustand.

Beim Durchfließen des Reaktors 1 löst das im überkritischen Zustand befindliche Kohlendioxid einen großen
15 Teil der im wesentlichen lipidhaltigen organischen Materie des Knochens auf. Insbesondere löst es die Fette der in den Knochengewebe enthaltenen Markgewebe auf.

Aufgrund der Eigenschaften von überkritischen Fluiden ist diese Extraktion sehr wirksam. Insbesondere werden die
20 Fette, die normalerweise für die chemischen Lösungsmittel unzugänglich sind, die in den bekannten Verfahren zum Einsatz kommen, mit dem Kohlendioxid im überkritischen Zustand extrahiert.

Um die mit dem Kohlendioxid durchgeführte
25 Lipidextraktion zu regulieren, werden die Extraktabscheider 11 und 14 ständig geleert und die Fettrückstände zurückgewonnen. Man läßt das Knochengewebe in Kontakt mit dem überkritischen Kohlendioxid, während Fettrückstände am Ausgang 12, 18 der Abscheider 11, 14 zurückgewonnen werden.
30 Die Dauer der Behandlung variiert je nach dem Gewicht des zu behandelnden Knochengewebes und dem Ausstoß an überkritischem Kohlendioxid, das in den Reaktor 1 eingeleitet wird. Daher kann das Verfahren unterbrochen und die Kohlendioxidmenge reguliert werden, die das
35 Knochengewebe durchfließt, dessen Masse ebenfalls geregelt wird. Man weiß in der Tat, daß die Masseausbeute der Extraktion eine Konstante ist. Somit kann mit Hilfe eines

15.06.99

11

Masseausstoßmeßgerätes, das seriell am Ausgang des Reaktors 1 installiert ist, das Verfahren unterbrochen werden, wenn die verwendete Kohlendioxidmasse ausreicht.

Man wird feststellen, daß die extrahierten Elemente zu
5 mehr als 98% aus Fett bestehen. Was das Knochengewebe betrifft, so enthält es nach der Behandlung durchschnittlich weniger als 2% Fett, und das auf homogene Weise. Und sein Kompressionswiderstand liegt in der Größenordnung von 10 bis 20 MPa.

10 Man wird feststellen, daß im Gegensatz zu dem, was konventionell in einem chemischen Reaktor geschieht, danach nicht das Extrakt (im wesentlichen lipidhaltige Materie), sondern Restmenge (Knochengewebe) verwendet wird.

Und das Fluid im überkritischen Zustand hat somit die
15 Doppelfunktion des Verstärkens des Knochenmaterials, wodurch seine biomechanischen Eigenschaften verbessert werden, und des Reinigens des Knochenmaterials.

Das auf diese Weise behandelte Knochengewebe wird dann einer ergänzenden konventionellen chemischen oder
20 enzymatischen Behandlung unterzogen, um bestimmte Proteine zu extrahieren. Die ergänzende chemische Behandlung kann mit Wasserstoffperoxid erfolgen, während die enzymatische Behandlung mit Hilfe von Protease stattfinden kann. Diese ergänzende Behandlung gewährleistet eine verbesserte
25 Proteinextraktion aus dem Knochengewebe und verringert insofern das Abstoßungsrisiko des auf diese Weise behandelten Knochengewebes.

Danach wird das Knochengewebe gewaschen. Diese Wäsche erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Bädern mit
30 destilliertem Wasser mit einer Temperatur zwischen 30° und 60°C.

Darauf folgt ein Schritt der Dehydratisierung und Desinfektion des Knochengewebes. Bei diesem Schritt wird das Gewebe durch mehrere aufeinanderfolgende Ethanolbäder mit
35 zunehmender Konzentration geleitet, zum Beispiel 70, 95 und 100%. Man wird feststellen, daß das Ethanol, da es ein ausgezeichnetes Viruzid ist, gleichzeitig zum

15.05.99

12

Dehydratisieren des Gewebes und zum Erhöhen der Infektionssicherheit des Biomaterials verwendet werden kann. Eine Trocknung in einem Ventilationsofen bei einer Temperatur zwischen 30 und 60°C vervollständigt das

5 Verfahren.

Das Knochengewebe wird dann nach dem Verpacken sterilisiert. Diese Sterilisation kann durch Bestrahlung mit Beta-Partikeln oder mit Gammastrahlen (25 k Gray) erfolgen. Eine eventuelle Beschneidung des Knochengewebes vor der
10 Implantation ist möglich, um es an das Knochengewebe des Empfängers anzupassen. In der Tat ist das auf diese Weise behandelte Knochengewebe relativ hart und kann ohne Abbröckeln verkleinert werden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der
15 Analysen eines unbehandelten Knochengewebes (Beispiel 1), eines Knochengewebes, das einmal mit CO₂ im überkritischen Zustand behandelt wurde (Beispiel 2) und von Knochengeweben aufgeführt, die mit CO₂ behandelt und einem Ergänzungsschritt unterzogen wurden, entweder chemisch (Beispiel 3) oder
20 enzymatisch (Beispiel 4).

Es sind die jeweiligen Gehaltswerte an organischer Materie (MO), organischem Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Lipidrückstand (Lipiden) sowie der Kompressionswiderstand für jedes dieser vier Beispiele angegeben. Die angegebenen
25 Werte sind Mittelwerte; die Werte in Klammern bedeuten die Toleranzspanne.

Die analysierten Knochengewebe stammten von distalen Extremitäten der bovinen Femur.

		Beispiel 1: unbehandelter Knochen	Beispiel 2: mit CO ₂ behandelter Knochen	Beispiel 3: mit CO ₂ + Wasserstoff- peroxid (H ₂ O ₂) behandelter Knochen	Beispiel 4: mit CO ₂ + Protease behandelter Knochen
5	MO (%)	62,7 (50,0-70,3)	23,0 (21,6-25,7)	20,8 (18,9-21,9)	20,6 (16,1-23,6)
	C (%)	44,8 (43,1-46,5)	10,8 (10,1-12,4)	9,2 (8,7-10,3)	9,8 (8,8-11,6)
	N %	2,4 (2,2-2,6)	4,1 (3,9-4,3)	3,9 (3,3-4,3)	4,0 (3,0-4,7)
	Lipide (%)	51,3 (24,7-77,3)	1,9 (0,6-5,3)	1,5 (0,8-3,0)	1,7 (0,8-2,8)
10	Kompressions- widerstand	8,9 MPa	16,9 MPa	10,7 MPa	11,5 MPa

Eine zweite, identische Versuchsreihe wurde mit bovinem Knochen eines anderen Ursprungs durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse als Mittelwerte über 38 Messungen für die Beispiele 1 bis 4, über 39 Messungen für Beispiel 2 und über 28 Messungen für Beispiel 3 angegeben.

20		Beispiel 1	Beispiel 2	Beispiel 3	Beispiel 4
	MO (%)	62.1	22.8	19.6	20.6
	C (%)	46.6	10.8	8.6	9.6
	N (%)	2.4	4.1	3.6	4.1
	Lipide (%)	51	1.1	0.7	1.3
25	Kompressions- widerstand	10.42 MPa	14.91 MPa	10.65 MPa	11.54 MPa

Im Vergleich zu einer einzigen Behandlung mit einem Fluid im überkritischen Zustand (Beispiel 2) wird für die Beispiele 3 und 4 ein geringer Gehalt an Kohlenstoff und Stickstoff und allgemeiner an organischer Materie festgestellt. Dieser geringe Gehalt entspricht der Eliminierung der nicht lipidhaltigen Fraktion der Markgewebe sowie der Auflösung der löslichen Proteine des Knochengewebes. Dieser Vorgang erlaubt eine beträchtliche Reduzierung der Entzündungsreaktionen und verbessert die

Knochenübertragung noch weiter, wie anhand von Erfahrungen sichtbar ist, die an Tieren gesammelt wurden.

Man wird feststellen, daß die biomechanischen Eigenschaften dieser Implantate statistisch gesehen besser
5 sind als die des Knochens, von dem sie gewonnen wurden (Beispiel 1). In der Tat ist der Kompressionswiderstand eines behandelten Knochengewebes dem des unbehandelten Referenzknochengewebes überlegen.

Man wird anhand einer Variante des oben beschriebenen
10 Verfahrens feststellen, daß die Schritte des Reinigens und Zerschneidens des Knochengewebes auf die folgende Weise durchgeführt werden können.

Der Reinigungsschritt kann unter Verwendung eines Sandstrahlverfahrens durchgeführt werden, wobei der Knochen mit
15 Korund (Aluminiumoxid) bei einem Druck zwischen 4×10^5 und 10^6 Pa von sämtlichem weichem anhaftendem Gewebe, einschließlich der Knochenhaut, befreit wird. Diese Technik ist weitaus schneller und wirksamer als die traditionellen Methoden, die vollkommen manuell durchgeführt werden,
20 während das Sandstrahlen vollkommen maschinell mit Automaten erfolgen kann.

Der Schneidschritt wiederum kann mit Hilfe eines Wasserstrahls erfolgen. Ein solches Schneiden erlaubt eine Präzision von bis zu $10 \mu\text{m}$, es erfolgt mit einem Strahl aus
25 reinem Wasser, so daß jedes Verschmutzungsrisiko vermieden wird, das bei einem Schneidwerkzeug gegeben ist, und es ist industriell anwendbar.

Die vorliegende Erfindung ist natürlich nicht auf die gewählte Durchführungsweise beschränkt und umfaßt alle
30 Varianten, die für die Fachkraft einleuchtend sind. So kann der Schritt der chemischen Reinigung mit Hilfe eines Fluids im überkritischen Zustand durch Zugabe eines Fluids erfolgen, das in dem Fluid im überkritischen Zustand aufgelöst ist und dessen besondere Wirkung auf das
35 Knochengewebe im selben Reaktor stattfinden kann.

Somit ist es möglich, die Gesamtheit der Entproteinisierungs- und Entlipidisierungsreaktionen am

15.06.99

15

selben Ort (dem Reaktor) und zur selben Zeit durchzuführen.
Darüber hinaus hat das auf diese Weise in dem Fluid im
überkritischen Zustand aufgelöste Fluid eine Temperatur und
einen Druck, die für diese Reaktionsart äußerst günstig
5 sind.

Wenn also Proteine von Markgeweben oder von der
extrazellulären Knochenmatrix oder auch zelluläres
Markdebris entfernt werden sollen, dessen hohes
Antigenvermögen zum großen Teil für Immunreaktionen
10 verantwortlich ist, dann können vorteilhafterweise
Detergenzien, Oxidationsmittel der organischen Materie,
spezifische Enzyme dieser oder jener Reaktion und
allgemeiner ausgedrückt jede Substanz in den
Reaktorkreislauf eingeleitet werden, die für die gewünschte
15 Behandlung ausreicht, in dem Maße, in dem sie von dem CO₂ im
überkritischen Zustand aufgelöst wird.

Man wird feststellen, daß das oben beschriebene
Verfahren und Biomaterial mit menschlichen und tierischen
Knochen durchgeführt bzw. erhalten werden können. Sie sind
20 für die Realisierung eines Transplantats anwendbar,
insbesondere für orthopädische Anwendungen, sowie bei
solchen Anwendungen, bei denen das Transplantat mechanisch
beansprucht wird, wie zum Beispiel: in der
Wirbelsäulenchirurgie (Halswirbelfusion, Bandscheibenersatz
25 ...), bei der Neubildung von Gelenkpfannen, in der
throplastie, der Osteotomie, der Pseudarthrose, der
Arthrodesese...

15.08.99

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Behandlung von tierischen oder menschlichen Knochengewebe für den Erhalt eines Biomaterials, das in einen Menschen implantiert und mechanisch beansprucht werden kann, wobei das Knochengewebe von der gesamten es umgebenden organischen Materie mechanisch gereinigt und die organische Materie aus dem Knochengewebe extrahiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens einen Schritt beinhaltet, in dem ein Fluid im überkritischen Zustand in die Gesamtheit des Knochengewebes eindringen gelassen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe in einem überkritischen Fluidstrom plaziert wird, der es durchfließt.
3. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Schritt ein Schritt ist, in dem die in dem Gewebe vorhandene, im wesentlichen lipidhaltige organische Materie extrahiert und in dem Fluid im überkritischen Zustand aufgelöst wird.
4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt:
 - a) mechanisches Reinigen des Knochengewebes von der gesamten es umgebenden organischen Materie,
 - b) Zerschneiden dieses Knochengewebes nach einer vorbestimmten Form,
 - c) Reinigen des Knochengewebes, um daraus die für eine gute Neuimplantation schädlichen Bestandteile zu extrahieren, wobei in die Gesamtheit des Knochengewebes ein Fluid im überkritischen Zustand eindringen gelassen wird, das in der Lage ist, die in dem Gewebe vorhandene, im wesentlichen lipidhaltige organische Materie aufzulösen und zu extrahieren,
 - d) Waschen, Dehydrieren und Sterilisieren des auf diese Weise gereinigten Knochengewebes.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Reinigungsschritt c) außerdem die chemische und/oder enzymatische Behandlung des Knochengewebes beinhaltet, um

15.06.99

17

bestimmte Proteinrückstände daraus zu extrahieren.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das verwendete Fluid im überkritischen Zustand Kohlendioxid (CO_2) ist.

5 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Kohlendioxid (CO_2) im überkritischen Fluidzustand eine Temperatur in der Größenordnung von 31° bis 60°C aufweist und mit einem Druck in der Größenordnung von $1,5 \times 10^7$ bis 4×10^7 Pa beaufschlagt wird.

10 8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluid im überkritischen Zustand bestimmte aufgelöste Fluide enthält, wobei diese bestimmten Fluide zum Extrahieren von Proteinen oder anderen bestimmten Substanzen aus dem Knochengewebe verwendet werden können.

15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß bestimmte Fluide zum Extrahieren von bestimmten Proteinen aus dem Knochengewebe in einem Waschschrift verwendet werden, der nach dem Schritt durchgeführt wird, in dem das im überkritischen Zustand
20 befindliche Fluid verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe durch Aluminiumoxidsandstrahlen mechanisch gereinigt wird.

11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch
25 gekennzeichnet, daß das Knochengewebe mit einem Hochdruckwasserstrahl zerschnitten wird.

12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe nach seiner Behandlung mit dem Fluid im überkritischen Zustand gewaschen wird,
30 indem es durch mehrere aufeinanderfolgende Bäder mit destilliertem Wasser mit einer Temperatur zwischen 20° und 60°C geleitet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe nach dem Waschen dehydriert und
35 desinfiziert wird, indem es durch mehrere aufeinanderfolgende Ethylalkoholbäder mit zunehmender Konzentration geleitet wird, worauf es in einem belüfteten

15.08.99

18

Wärmeschränk mit einer Temperatur zwischen 31° und 60°C getrocknet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Knochengewebe nach der Dehydration nach dem Verpacken
5 durch Bestrahlung sterilisiert wird.

15. Biomaterial, das in einen Menschen implantiert und gemäß dem Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche erhalten werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß es aus tierischem oder menschlichem Knochengewebe besteht und mit
10 einem Fluid im überkritischen Zustand in Kontakt gebracht wird, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Lipidrückstand von weniger als 2% und einen Äquivalentwiderstand hat, der größer ist als der des natürlichen Knochens.

16. Biomaterial nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
15 daß es einen Kompressionswiderstand in der Größenordnung von 10 bis 20 MPa aufweist.

15.08.99

1/1

Einzigste Figur

